

Aus dem Hygienischen Institut der Stadt
und Universität Frankfurt am Main
(Direktor: Prof. Dr. med. H. Schlossberger)

Experimentelle Untersuchungen zur Differen-
zierung der hautwirksamen und hämosensibili-
sierenden Eigenschaften von gereinigtem Tu-
berkulin (GT Hoechst)

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde der
Hohen Medizinischen Fakultät der
Johann Wolfgang Goethe - Universität
in Frankfurt am Main

vorgelegt von:
Günter Becker

aus

Eschwege

1955

Aus dem Hygienischen Institut der Stadt
und Universität Frankfurt am Main
(Direktor: Prof. Dr. med. H. Schlossberger)

Experimentelle Untersuchungen zur Differen-
zierung der hautwirksamen und hämosensibili-
sierenden Eigenschaften von gereinigtem Tu-
berkulin (GT Hoechst)

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde der
Hohen Medizinischen Fakultät der
Johann Wolfgang Goethe - Universität
in Frankfurt am Main

vorgelegt von:
Günter Becker

aus
Eschwege

1955

Meinen lieben Eltern in Dankbarkeit
gewidmet.



Als gegen Ende vorigen Jahrhunderts ROBERT KOCH den Erreger der Tuberkulose fand, erfasste ihn und die Welt eine grosse Begeisterung. Mit dem von ihm bald darauf entwickelten Alt-Tuberkulin glaubte er einer der grössten Geisseln der Menschheit Herr zu werden, indem das Präparat eine Vorbeugung und auch Heilung der Tuberkulose ermöglichen sollte.

Es zeigte sich aber bald, dass mit dem Tuberkulin weder eine Immunität noch eine Heilung zu erzielen war. Die grosse Enttäuschung hierüber konnte allerdings später dadurch etwas gedämpft werden, als man feststellte, dass das Tuberkulin sich bei der Durchführung einer Hautreaktion als wertvolles Tuberkulose-Diagnostikum eigneté.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit ergab sich für das Tuberkulin in serologischer Hinsicht, nachdem MIDDLEBROOK und DUBOS (10) 1948 und MIDDLEBROOK (8) 1950 die indirekte Hämagglutinations- bzw. die Hämolysereaktion bekanntgegeben hatten.

Die Meinungen über die chemische Beschaffenheit der für die Hautwirksamkeit und die Hämosensibilisation verantwortlichen Tuberkulin-Substanzen gehen weit auseinander.

Im Bestreben, ein von unspezifischen Nebenwirkungen möglichst freies Präparat zu entwickeln, benutzte man als Ausgangsstoff vielerorts das Alt-Tuberkulin. ROBERT KOCH stellte dieses Tuberkulin her, indem er Tuberkelbakterien auf Glycerin-Bouillon züchtete, die Kulturen nach 6- bis 8-wöchigem Wachstum im strömenden Wasserdampf sterilisierte, auf 1/10 ihres Volumens einengte und von den Bakterienresten abfilterte. Er selbst machte sich Gedanken über die chemische Beschaffenheit seines Tuberkulins und neigte zu der Annahme, es läge ein Eiweisskörper vor. Die Nebenwirkungen, die beim Haut-Test mit dem Alt-Tuberkulin auftreten, muss man auf genuine unspezifische Ballaststoffe (z.B. Pepton) zurückführen.

Trotz der von einigen wenigen Autoren ¹⁾ (MUCH, DESBORDES, TREMEAU, BIELING u. a.) vertretenen anderweitigen Auffassungen darf man nach dem heutigen Stand der Wissenschaft im Tuberkulo-Protein die beim Haut-Test wirksame spezifische Substanz erblicken. Diese Ansicht gründet sich vor allem auf die Untersuchungen von SEIBERT (15).

SEIBERT (14) stellte ihr Präparat P. P. D. (Purified Protein Derivative) so her, dass sie (ähnlich wie R. Koch) die Kulturen im Wasserdampf sterilisierte und die Bakterien abfilterte. Nach Zusatz von Glycerin wurde auf 1/5 bis 1/10 eingengt und mit Phenol-Lösung verdünnt. Dieses Ausgangs-Tuberkulin wurde nun durch Ultrafiltration von allen niedermolekularen Bestandteilen befreit und daraus durch Füllen mit Trichloressigsäure die Ei-

1) s. bei (7)

weissfraktion gewonnen und auf Trockenpräparat verarbeitet. Das P.P.D. enthält nicht nur reine Eiweissderivate, sondern auch noch recht erhebliche Mengen an Verunreinigungen (etwa 20 % Nucleinsäure und etwa 25 % Kohlehydrate). Dieselbe Aussage betrifft wohl auch das englische P.P.D. Weybridge und das dänische P.P.D. Kopenhagen.

Später gelang es SEIBERT¹ und GLENN (16) dieses Tuberkulin weitgehend von diesen Stoffen zu befreien und brachten es als P.P.D. -S auf den Markt. Eingehendere Untersuchungen ergaben, dass 3 verschiedene Eiweisskomponenten vorliegen, die SEIBERT (15) mit A, B und C bezeichnete. Ihre Molekulargewichte sind untereinander verschieden und liegen etwa zwischen 10000 und 36000. Dieses Tuberkulin besitzt eine starke Hautwirkung.

Aus den in Phenol löslichen Substanzen des gereinigten Tuberkulins IP 48 wird durch alkoholische Fällung die Fraktion Pt. erhalten, die bei einem N-Gehalt von 14,3-14,7 % keine Reaktionen auf Zucker ergibt und elektrophoretisch homogen erscheint. Dieses Protein ist ausserordentlich hautwirksam.

Das von LAMENSANS, GRABAR und BRETEY (6) aus einer in Phenol unlöslichen Fraktion des gereinigten Tuberkulins IP 48 durch wiederholte Alkoholfällungen isolierte IP 48 St besitzt Polysaccharidcharakter (bei einem N-Gehalt von 0,42 %) und erweist sich elektrophoretisch homogen. Dieses Präparat besitzt nur eine sehr schwache Tuberkulinaktivität im Sinne der Hautwirksamkeit.

Das GT Hoechst, mit dem unsere später zu beschreibenden Versuche ausgeführt wurden, stellt ein aus dem Alt-Tuberkulin mittels einer Kombination von Ammonsulfat- und Trichloressigsäurefällungen hergestelltes hochgereinigtes Tuberkulinpräparat dar, "welches fast nur aus spezifischen Eiweissderivaten besteht, die allerdings nicht einheitlich sind, sondern Fraktionen verschiedener Molekülgrösse enthalten (8000-16000). In ihnen ist das zur Zeit praktisch erreichbare Höchstmass an Reinheit und Spezifität gegeben, sie stellen aber nicht das reine Tuberkulin an sich dar, wenn wir darunter eine einzige Wirksubstanz verstehen, die vom Tuberkelbazillus gebildet wird." (Lindner (7)). -

Über die chemische Beschaffenheit des Tuberkulo-Hämosensitins können bis heute keine eindeutigen Angaben gemacht werden. MIDDLEBROOK und DUBOS (10) stellten Versuche an mit Extrakten aus Tuberkelbakterien und mit Alt-Tuberkulin. Sie glauben, dass die hämosensibilisierende Wirkung auf verschiedene Fraktionen zurückzuführen ist, wenn auch den Polysacchariden die Hauptwirkung zukommen dürfte. Für diese Annahme spricht die Tatsache, dass die aus dem Tuberkulin IP 48 isolierte Polysaccharidfraktion St sich vorzüglich zur Hämosensibilisation eignet, während die Proteinfraction hierzu nicht imstande ist. Nachdem aber BRODHAGE (2) feststellen konnte, dass reine Polysaccharide keine sensibilisierende Wirkung auf die Erythrocyten haben, neigte er zu der Auffassung, dass der sensibi-

sierende Effekt an einen Protein-Polysaccharidkomplex gebunden ist. BOYDEN (1) ist andererseits der Meinung, dass die Proteine erst dann sich an die Erythrocyten lagern können, wenn vorher die Polysaccharide auf sie einwirken konnten. Er kam zu dieser Schlussfolgerung auf Grund der Beobachtung, dass native Eiweisskörper keine Bindung an Erythrocyten eingehen können, es sei denn, letztere sind durch irgendwelche Stoffe (z.B. Tanninsäure) für die Eiweissadsorption präpariert worden. GERNEZ-RIEUX und TACQUET (3), sowie HALL (5) LAMENSANS, GRABAR und BRETEY (6) machen die chemische Reinheit von Proteinen bzw. Polysacchariden für die fehlende Adsorptionsfähigkeit an Blutkörperchen verantwortlich. SCHIFF (12) führt das differierende Sensibilisationsvermögen verschiedener Tuberkuline bei etwa gleicher biologischer Wirksamkeit auf differente substantielle Ursachen zurück, da es sich zeigt, dass die Hautreaktion und die indirekte Hämagglutination nicht unbedingt konform gehen, weil für einen gleich grossen Reaktionseffekt beim Hämagglutinations- bzw. Hämolysetest mit verschiedenen Tuberkulinen unterschiedliche Tuberkulinmengen (gemessen an ihrem Gehalt an T.E.) nötig sind. Er vermutet, dass weitere bzw. geeignetere Hämosensitine noch gefunden werden können, auch wenn solche Substanzen keine biologische Aktivität besitzen. Seine Auffassung konnte SCHIFF insofern beweisen, als es ihm gelang, durch fermentative Behandlung von GT Hoechst mittels Papain die biologische Aktivität dieses Tuberkulins weitgehend aufzuheben, während die hämosensibilisierende Wirkung in keiner Weise beeinträchtigt wurde. Dies erbrachte gleichzeitig deutliche Hinweise dafür, dass die hautwirksamen und hämosensibilisierenden Eigenschaften dieses gereinigten Tuberkulins auf verschiedenen substantiellen Ursachen beruhen und es wurde auf Grund der weitgehenden Übereinstimmung im Sinne der Spezifität des Proteinderivates GT Hoechst mit dem Polysaccharidpräparat IP 48 St geschlossen, dass es sich in beiden Fällen um dasselbe Hämosensitin handelt.

Zur Stützung dieser Auffassung sollte nun in vorliegender Arbeit geprüft werden, inwieweit sich ausser Papain die Proteinase Trypsin und Pepsin auf die hautwirksamen und hämosensibilisierenden Eigenschaften von GT Hoechst auswirken, welche serologischen Unterschiede durch diese proteolytischen Prozesse sich gegenüber dem normalen Tuberkulin einstellen und welche Schlüsse sich hieraus im Hinblick auf die Frage des eigentlichen Hämosensitins ableiten lassen.

Diese Untersuchungen erstreckten sich auf die Testung der Hautwirksamkeit des Tuberkulins GT Hoechst vor und nach Fermenteinwirkung an 15 tuberkulösen und 8 gesunden weissen Meerschweinchen (in 3 verschiedenen Versuchsserien) und der Prüfung dieser fermentbehandelten und -unbehandelten Tuberkulinproben mittels der indirekten Hämagglutinations- und Hämolysereaktion bei Verwendung mehrerer Tuberkuloseseren.

Serologische Reaktionen:

Grundsätzlich wurden zur Sensibilisierung von je 0,1 ccm Hammel-Blutkörperchensediment jeweils 2,5 ccm Tuberkulinlösung verwendet, in der 75000 tatsächliche bzw. ursprüngliche Tuberkulin-Einheiten enthalten waren.

Benutzt wurden Kahngläschen von 11 mm Durchmesser und 90 mm Höhe. Als Antigeneträger nahmen wir mit Glasperlen defibriniertes, 1 bis 4 Tage altes bei 5° C aufbewahrtes Hammelblut. Zur Sensibilisation standen die Blutkörperchen unter öfterem leichten Schütteln 2 Stunden im 37° C-Wasserbad. Nach dreimaligem Waschen in physiologischer NaCl-Lösung (unter Zentrifugieren bei etwa 1500 Umdr./min.) wurde das sensibilisierte Sediment in 15,0 ccm physiologischer NaCl-Lösung aufgenommen (0,66 %ige Gebrauchssuspension).

Vor ihrer Verwendung wurden die höchstens 8 Tage alten positiven Tuberkuloseseren 1/2 Stunde bei 56° C inaktiviert, auf 1/8 verdünnt und mit normalem Hammel-Blkp.-Sediment absorbiert (10 Teile 1/8 Serum mit 1 Teil Blutkörperchensediment).

Zu je 0,3 ccm Abgussverdünnung (1 : 8, 1 : 16, 1 : 32 usw.) wurden je 0,3 ccm der Gebrauchssuspension hinzugefügt. Eine Kontrolle des absorbierten Serums gegen eine 0,66 %ige Aufschwemmung normaler Hammel-Blutkörperchen wurde mitgeführt. Nach einer Inkubationszeit von etwa 15 Stunden bei Zimmertemperatur erfolgte die makroskopische Ablesung.

Hämolysereaktion:

Zuverlässige Ergebnisse bei der Hämolysereaktion werden mit konservierten Komplementpräparaten erzielt. Es wird von 20 - 30 Meerschweinchen ein Mischserum hergestellt, das zur Konservierung im Tiefkühlschrank bei etwa -15° C aufbewahrt wird und für die Dauer von etwa 2 - 3 Wochen eine konstante Komplementwirkung zeigt.

Vor Gebrauch wurde nun das Komplement mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnt und mit gewaschenem Hammel-Blutkörperchensediment 1 Stunde bei 5° C absorbiert (Absorptionsverhältnis: 10,0 ccm auf 1/10 verdünntes Komplement zu 1,0 ccm Hammelblutkörperchensediment). Nach anschliessendem Zentrifugieren wurde das absorbierte Komplement bis zur baldigen Verwendung bei 5° C aufbewahrt.

Um möglichst spezifische Reaktionsabläufe ¹⁾ zu erhalten, führten wir den von SCHIFF (12) angegebenen Vorversuch durch:

Es wurden in 9 Gläschen je 0,3 ccm einer geeigneten Überschussmenge eines gewöhnlichen Hammel-Blut-Ambozeptors (d.h. etwa die 10- bis 40-fache Konzentration der bei 0,1 ccm 1/10 Komplement hämolysierenden Ambozeptor-Minimaldosis) mit 0,1 ccm verschiedener Komplementverdünnungen und jeweils 0,3 ccm einer 0,66 %igen Suspension von normalen Hammelblutkörperchen für eine Stunde im 37° C-Wasserbad belassen. Für den Hauptversuch wurde die 4-fache Menge jener Komplementdosis genommen, die im Vorversuch gerade noch eine komplette Hämolysse bewirkte.

Die Absorption der Seren und die Herstellung der 0,66 %igen Suspension, von tuberkulinisierten Hammelerythrocyten erfolgte wie Seite 6 beschrieben.

Auf je 0,3 ccm Serumabgussverdünnung kommen je 0,1 ccm Komplement und jeweils 0,3 ccm gebrauchsfertige Blutkörperchensuspension. In 2 jeweiligen Serumkontrollen wurden bei Beibehaltung der übrigen Komponenten a) der Komplementzusatz durch 0,1 ccm physiologischer NaCl-Lösung, b) die Antigensuspension durch 0,3 ccm einer 0,66 %igen normalen Hammel-Blutkörperchenaufschwemmung ersetzt; als Reaktionskontrolle diente ein Gläschen, in dem 0,3 ccm Serumverdünnung durch 0,3 ccm physiologischer NaCl-Lösung ersetzt worden waren. Die Reaktionsgemische wurden für eine Stunde ins 37° C-Wasserbad gestellt. Nach jeweils 15 min. schüttelten wir den Gläscheninhalt leicht auf.

Bei der indirekten Agglutinations- und Hämolysereaktion wurden eine bei Serumverdünnung 1/8 oder darüber eingetretene Agglutination bzw. Hämolysse wie folgt bewertet:

Bewertung der Hämagglutination:

+	+	+	=	
+	+	=		Positive Reaktionen
+	=			
+	=			kleinste Agglutinate ²⁾
-				
-	=			Negative Reaktionen

1) sensibilisierte Blkp. sind gegenüber einem Zuviel an Komplement sehr empfindlich.

2) Sie waren nur mit der Lupe zu erkennen und blieben bei der Titerbestimmung unberücksichtigt.

Bewertung der Hämolyse :

k	=	komplett
fk	=	fast komplett
st	=	stark
m	=	mässig
w	=	wenig
sp	=	Spur
o	=	keine Hämolyse

Nur eine eingetretene komplette Hämolyse wurde als positiv bewertet.

Zur Durchführung der Hautreaktionen wurden 300 - 350 g schwere weisse Meerschweinchen mit Tuberkelbakterien des Stammes Tb. 1 ¹⁾ infiziert; pro Tier injizierten wir subcutan in den Nacken 0,5 einer Bakterien-Suspension, die in 5,0 ccm physiologischer NaCl-Lösung 1 mg feuchte Tuberkelbakterienmasse enthielt. Nach 4 - 5 Wochen standen die Tiere für die Hauttests zur Verfügung.

In Anwendung kam Tuberkulin GT Hoechst sowohl in gelöster Form (Op. Nr. 30) mit je 75 000 T.E. pro ccm als auch Trockensubstanz (Kontr.-Nr. 7) ²⁾, die in Abfüllungen zu je 10 mg 750 000 T.E. enthielt.

Als Fermente wurden verwandt:

Papain 1 : 350 (Merck)

Trypsin (mind. 40 000 Fuld-Gross Einht./pro g)

Merck

Pepsin 1 : 10 000 (Bayer)

Für die Fermentbehandlung beider Tuberkulinarten wurden folgende Lösungen verwendet:

-
- 1) Dieser hochvirulente Tbk. -Stamm wurde uns freundlicherweise vom Paul Ehrlich-Institut in Frankfurt/Main überlassen.
 - 2) Diese Trockensubstanz überliessen uns in dankenswerter Weise die Farbwerke Hoechst.

Citratpuffer:

2,1 g Zitronensäure

20,0 g 1 n-NaOH

mit Aq. bidest auf 100,0 ccm aufgefüllt.

93,0 ccm dieser Lösung A

+ 4,0 ccm 1/10-NaOH = pH 5

HCl - Citratpuffer:

31,0 ccm obiger Lösung A

+ 69,0 ccm 1/10 - HcL = pH 2

Saure Phosphatlösung:

3,0 g prim. K. -Phosphat

+ 15,0 ccm Aq. bidest.

Phosphatpuffer:

2,0 ccm 1/15 mol. prim. K. -Phosphatlösung

98,0 ccm 1/15 mol. sek. Na. -Phosphatlösung = pH 8,4

Konz. Phosphatpuffer:

2,9 g prim. Na-Phosphat = in Aq. bidest. ad

+ 12,5 g sek. Na-Phosphat = 100,0 ccm lösen.

Gepufferte NaCl-Lösung (physiologische):

2,0 ccm konz. Phosphatpufferlösung

+ 98,0 ccm physiologische NaCl-Lösung (0,85%ig) = pH 7,3

Herstellung der einzelnen Testflüssigkeiten

1.	2.	3.	
GT Hoechst normal	mit Papain behandeltes GT Hoechst	Papain-Kontrollösung	
	100 mg Papain 5 " Cystein + 10,0 ccm Citratpuffer (pH 5)		
	30 min. unter öfterem Schütteln im 37° C-Wasserbad, anschliessend papierfiltriert.		
2,5 ccm gep. NaCl-Lösung + 10 mg GT Hoechst	davon 2,5 ccm + 10 mg GT Hoechst	davon 2,5 ccm	
4.	5.	6.	7.
mit Trypsin behandeltes GT Hoechst	Trypsin-Kontroll- Lösung	mit Pepsin behandeltes GT Hoechst	Pepsin-Kon- trollösung
40 mg Trypsin + 10,0 ccm Phosphatpuffer (pH 8,4)		40 mg Pepsin + 10,0 ccm HCl-Citrat- puffer (pH 2)	
30 min. im 37° C-Wasserbad, anschliessend papierfiltriert.			
davon 2,5 ccm zur Lösung von 10 mg GT Hoechst	davon 2,5 ccm	davon 2,5 ccm zur Lö- sung von 10 mg GT Hoechst	davon 2,5 ccm

Diese 7 verschiedenen Lösungen standen 48 (für Versuchsserie I und III) bzw. 72 Stunden (für Versuchsserie II) bei 37° C. Hierauf wurde mittels weniger Tropfen n-NaOH ein pH-Wert von 7 ($\pm$ 0,2) eingestellt, ausser den Lösungen 4 und 5, bei denen dies mit 1 Tropfen der sauren K-Phosphatlösung geschah.

Sodann erfolgte im Einzelfall eine Angleichung der einzelnen Flüssigkeitsmengen mittels gepufferter NaCl-Lösung. Anschliessend wurden die 7 Lösungen zwecks Fermentinaktivierung 15 min. im Wasserbad gekocht, die einzelnen Gläschen zentrifugiert und die überstehenden Flüssigkeiten abgehoben.

Zwecks Testung dieser verschiedenen Lösungen mittels der Intracutanreaktion wurden 0,3 ccm (= 90 000 T.E.) der insgesamt 2,5 ccm Tuberkulinlösung 1 (= 750 000 T.E.) 1,5 ccm gepufferte NaCl-Lösung hinzugefügt. Aus dieser Tuberkulinverdünnung von 5 000 T.E. pro 0,1 ccm wurden mittels gepufferter NaCl-Lösung weitere 4 Verdünnungen hergestellt, die pro 0,1 ccm 500, 50, 20 und 7 T.E. enthielten. Völlig entsprechend wurde mit den Lösungen 2 - 7 verfahren.

Zu der gleichzeitig mit den Haut-Tests erfolgten serologischen Prüfung (s. Tab. 3) wurden die einzelnen Ausgangslösungen zur Herstellung von 7 verschiedenen Antigen-Suspensionen verwendet, wobei die Sensibilisation von je 0,1 ccm Hammel-Blutkörperchen-Sediment durch jeweils 0,25 ccm der Lösung 1 - 7 (bei der Lösung 1 entsprach dies der hierfür üblichen Substanzmenge von 75 000 T.E.) unter jeweiligem Zusatz von 2,25 ccm gepufferter NaCl-Lösung erfolgte. Im übrigen wurde, wie auf Seite 7 beschrieben, vorgegangen.

TABELLE I

Intracutanreaktion

beim Meerschweinchen durch normales und mit Papain
Trypsin oder Pepsin behandeltes GT Hoechst.

Echter bzw. ursprüngl. Gehalt an T. E.	GT Hoechst normal				GT Hoechst nach Ferment- Behandlung:				Jeweilige Ferment- Kontrolle:			
Versuchsserie	I		II		I		II		I		II	
bei Anwendung von Papain:												
Tbk. - Tier Nr.:	1	2	10	11	1	2	10	11	1	2	10	11
5000 T.E.:	.	.	.	.	.	6	8r	i	i	6	6r	i
500 "	14r	9r	14rn	11r	i	i	i	i	i	i	i	i
50 "	8r	6r	7r	8r	i	i	o	i	o	i	o	o
20 "	6r	i	6r	6r	o	i	o	o	.	.	o	o
7 "	5r	o	5r	i	o	o	o	o	.	.	.	.
Kontr. Tier Nr.:	7	8	16	17	7	8	16	17	7	8	16	17
5000 T.E.:	i	o	5	o	i	o	i	o	6r	6r	6	i
500 "	i	o	i	o	i	o	o	o	i	o	i	i
50 "	i	o	i	o	i	o	o	o	.	.	o	i
bei Anwendung von Trypsin:												
Tbk. - Tier Nr.:	3	4	12	13	3	4	12	13	3	4	12	13
5000 T.E.:	.	.	.	.	7r	5r	14rn	11r	5r	5	7r	8r
500 "	16r	14r	17rn	13rn	i	i	10r	8r	i	5r	5	i
50 "	10r	6r	15r	9r	i	i	i	i	i	i	i	i
20 "	7r	i	11r	6r	i	i	o	i	.	.	i	i
7 "	5r	i	11r	5r	o	o	o	o	.	.	.	.
Kontr. Tier Nr.:	7	9	16	18	7	9	16	18	7	9	16	18
5000 T.E.:	i	i	5	5	i	5r	i	5	5r	o	i	i
500 "	i	o	o	o	i	i	o	i	o	i	i	5
50 "	o	o	i	i	o	i	o	i	.	.	i	i

TABELLE I (Fortsetzung)

Echter bzw. ursprüngl. Gehalt an T. E.	GT Hoechst normal				GT Hoechst nach Ferment- Behandlung				Jeweilige Ferment- Kontrolle:			
Versuchsserie	I		II		I		II		I		II	
	bei Anwendung von Pepsin:											
Tbk. - Tier Nr.:	5	6	14	15	5	6	14	15	5	6	14	15
5000 T. E.:	.	.	.	.	7r	6r	7	5	5r	i	i	o
500 "	14rn	12r	14rn	13r	5r	5r	i	i	i	i	i	o
50 "	11r	10r	11r	6r	i	i	i	o	i	i	i	o
20 "	9r	7r	9r	o	i	i	o	o	.	.	o	o
7 "	6r	5	5r	o	o	o	o	o	.	.	.	.
Kontr. Tier Nr.:	8	9	17	18	8	9	17	18	8	9	17	18
5000 T. E.:	i	o	o	5	7r	i	o	i	5r	o	o	i
500 "	o	o	o	o	i	o	o	o	.	o	i	o
50 "	o	o	o	o	i	o	o	o	.	.	i	o

Die Ziffern geben die Durchmesser der Alterationen in mm wieder

r = mit Rötung, n = mit Nekrosebildung, i = geringe Infiltrate (Unter 5 mm)

TABELLE II
Kontrollversuch

Echter bzw. ursprüngl. Gehalt an T. E.	GT Hoechst normal:			gekochtes Papain- GTH		gekochtes Pepsin- GTH		Papain GTH		Pepsin GTH	
	1	2	3	1	3	2	3	1	3	2	3
Tbk. - Tier Nr.:	1	2	3	1	3	2	3	1	3	2	3
500 T. E.:	16rn	16rn	15rn	17rn	17rn	15rn	15rn	5r	i	6r	i
50 "	11r	9r	9r	10r	9r	10r	11r	i	i	i	o
20 "	8r	7r	8r	8r	10r	7r	7r	i	i	i	o
7 "	5r	5r	5r	7r	5r	6r	5r	i	i	i	i
Kontr. Tier Nr.:	4	5		4	5	4	5	4	5	4	5
500 T. E.:	o	i		o	o	o	o	i	o	o	i
50 "	o	o		o	o	o	o	o	o	o	o

Die in Tabelle 1 wiedergegebenen Versuchsergebnisse der Versuchsserien I und II zeigen übereinstimmend, dass durch eine Proteolyse des Tuberkulins GT Hoechst praktisch völlige Aufhebung der spezifischen Tuberkulin-Hautreaktion erreicht wird. Hierbei scheint (bei Berücksichtigung der angewandten Methodik) die Wirkung von Papain und Pepsin der von Trypsin überlegen zu sein.

Der mit den beiden ersteren Präparaten erfolgte völlige Abbau der biologisch wirksamen Eiweiss-Substanz war auch noch bei der höchsten Tuberkulinkonzentration von 5000 T.E. zu beobachten, da die aufgezeigten geringen Werte im selben Umfang auch die Leerkontrollen betrafen.

Da es theoretisch denkbar wäre, dass durch die Anwesenheit des inaktivierten Ferments an sich die Tuberkulin-Hautreaktion abgeschwächt worden war, sollte durch eine weitere Versuchsreihe (Tabelle 2) diese Möglichkeit ausgeschlossen werden. Hierbei wurde bei Beachtung desselben Mengenverhältnisses durch Kochen inaktivierte Papain- bzw. Pepsinlösung dem Tuberkulin zugesetzt. Die Ergebnisse zeigen eine völlige Übereinstimmung dieser Kontrollreihen mit der Normalreaktion und bestätigen nochmal die zerstörende Wirkung der proteolytischen Fermente auf die biologisch aktiven Substanzen. Wie SCHIFF (12) nun aber zeigte, bleiben durch eine Papaineinwirkung jedoch die serologischen Eigenschaften von GT Hoechst völlig erhalten. Dies wird durch das in Tabelle 3 wiedergegebene Versuchsprotokoll der Versuchsserie II vollauf bestätigt und zwar auch für die Fermente Trypsin und Pepsin. Die serologischen Untersuchungen bei den Versuchsserien I und III stimmten hiermit völlig überein.

Somit wurden die Ergebnisse und Überlegungen dieses Autors bestätigt, dass die biologische und serologische Wirkung des Eiweisspräparates GT Hoechst auf verschiedene Substanzen zurückzuführen sind.

Demnach ist die hämosensibilisierende Tuberkulinfraction an eine Substanz gebunden, die für proteolytische Fermente unangreifbar ist, was die in Tabelle 3 aufgeführten Defunde erklärt, dass die Nativtiter eines Serums vor und nach Fermentbehandlung des GT Hoechst völlig unbeeinflusst bleiben.

Da nun die ledigliche Bestimmung des Nativtiters eine etwas grobe Methode darstellt, sollte durch Sensibilisierung von jeweils gleichen Hammel-Blutkörperchensedimentmengen mit abgestuften Tuberkulinkonzentrationen eine exaktere Antwort auf obige Frage gegeben werden. Auch die Neutralisations- und Absorptionsversuche dienen diesem Zweck.

TABELLE 3

Indirekter Hämagglutinations- und Hämolysetest bei Verwendung von normalem und mit Papain, Trypsin oder Pepsin behandeltem GT Hoechst

Tbk. -Serum Nr.12 getestet mit Suspensionen von Hammel-Blkp.,
die sensibilisiert worden waren mit:

	GT Hoechst normal	Papain behand. GT Hoechst	Trypsin behand. GT Hoechst	Pepsin behand. GT Hoechst	Papain Kontr. - Lösung	Trypsin Kontr. - Lösung	Pepsin Kontr. - Lösung
Ser. -Verd.	Hämagglutinations-Reaktion						
1 : 8	+++	+++	+++	+++	-	-	-
16	++	+++	+++	+++	-	-	-
32	++	+++	++	++	-	-	-
64	+	++	+	+	-	-	-
128	+	+	+	+	-	-	-
256	-	+	-	-	-	-	-
512	-	-	-	-	-	-	-
NaCl-Lösung	-	-	-	-	-	-	-
	Hämolysereaktion						
1 : 8	k	k	k	k	o	o	o
16	k	k	k	k	o	o	o
32	k	k	k	k	o	o	o
64	k	k	k	k	o	o	o
128	k	k	k	k	o	o	o
256	fk	fk	fk	k	o	o	o
512	m	m	m	m	o	o	o
1024	w	w	sp	sp	o	o	o
2048	o	o	o	o	o	o	o
NaCl-Lösung	o	o	o	o	o	o	o

Für diese Versuche, die sowohl mit Op. Nr. 30 als auch Op. Nr. 17 durchgeführt wurden, verwendeten wir das für die MIDDLEBROOK und DUBOS-Reaktion bestimmte, in flüssiger Form in Auslieferung gelangte GT Hoechst, da die Trockensubstanz uns nur in beschränkter Menge zur Verfügung stand. Die bereits vor etwa 1 1/2 Jahren zur Auslieferung gelangte Op. Nr. 17 befand sich hierbei gerade noch innerhalb der angegebenen Verwendungsdauer. Da sich bei den 3 mit Trockensubstanz durchgeführten Versuchsserien (s. Tab. 1, 2 und 3) herausstellte, dass mittels Pepsin wohl die beste Fermentwirkung zu erzielen war und diese Methode sich auch deswegen empfahl, weil durch Kochen (zwecks Fermentinaktivierung) kein Niederschlag sich einstellte, wurde für die folgenden Versuche lediglich Pepsin verwendet. Dieses brachten wir in HCl-Citratpuffer von pH=2 in der Konzentration, wie auf Seite 10 beschrieben wurde. Zur Herstellung der Fermentkontroll-Lösung wurde davon ein Teil 15 min. lang im Wasserbad gekocht, wobei ein weiss-flockiger Niederschlag sich bildete, der sich bei kräftigem Schütteln fein verteilte.

Die Herstellung des normalen und pepsinisierten flüssigen Tuberkulins der Op. Nr. 17 als auch der Op. Nr. 30 wurde nun sinngemäss wie zuvor beschrieben durchgeführt, wobei zu je 2 Teilen von normalem flüssigen GT Hoechst 3 Teile aktive bzw. inaktivierte Pepsinlösung hinzugefügt wurden. Die insgesamt erhaltenen 4 Lösungen wurden nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden bei 37° C neutralisiert. Die zur Neutralisation verbrauchten Tropfen glichen wir bei allen 4 Lösungen mittels gepufferter NaCl-Lösung aus, so dass bei allen gleiche Konzentrations- und Mengenverhältnisse geschaffen wurden. Nach 15 minutigem Kochen im Wasserbad waren alle 4 Lösungen frei von Niederschlag.

Die Versuche wurden unmittelbar hierauf (am selben Tage) durchgeführt. Das verwendete positive Tuberkuloseserum war bei sämtlichen Versuchsreihen das gleiche. Wir wählten für diese Versuche lediglich die Hämolysereaktion, da mit dieser Methode im Durchschnitt höhere Titer zu erhalten sind als mit der Hämagglutinationsreaktion. Ausserdem erweist sich diese Methode, worauf SCHIFF (12) deutlich hingewiesen hat, äusseren Einflüssen gegenüber weit weniger empfindlich.

Da durch Kontrollversuche festgestellt werden konnte, dass normales oder mit inaktiverter Fermentlösung gemischtes GT Hoechst dieselben Haut- und serologischen Reaktionsbefunde ergaben, wurden in den Tabellen 4, 5 und 6 nur die mit letzterem GT Hoechst erzielten Resultate wiedergegeben.

Sensibilisationsversuche:

Für die Sensibilisation jeweils gleicher Ha-Blkp. -Sedimente wurden jeweils gleich grosse Flüssigkeitsmengen verwandt, die a) normales, b) pepsinbehandeltes Tuberkulin in 4 verschiedenen Verdünnungen (1 : 2, 5, 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20) enthielten.

Diese 8 verschiedenen Antigenlösungen wurden mittels 8 paralleler Serumreihen ausgetestet.

Neutralisationsversuch:

Jeweils 0,3 ccm des mit Hammelblutkörperchen vorabsorbierten und auf 1/4 verdünnten Serums wurden mit je 0,3 ccm der verschiedenen Tuberkulinkonzentrationen der Op. Nr. 17 und Op. Nr. 30 von GT Hoechst normal einerseits und Pepsin-GT andererseits gemischt. Als Kontrolle wurde statt Tuberkulin physiologische (= 0,85 %ige) NaCl-Lösung hinzugefügt. Nach einstündiger Abbindung bei Zimmertemperatur wurden diese stufenweise neutralisierten Serumproben, sowie das "native" (d.h. nur mit Hammel-Blutkörperchen vorabsorbierte) Serum mittels der Hämolysereaktion geprüft. Auch zur Sensibilisation fanden einmal GT Hoechst, zum anderen Pepsin-GT Hoechst Anwendung.

Absorptionsversuch:

Die Tuberkulinisierung von Hammel-Blutkörperchensediment wurde mit Op. Nr. 17 und Op. Nr. 30 von GT Hoechst normal bzw. Pepsin-GTH wie üblich durchgeführt, wie auch die Herstellung der 0,66 %igen Antigensuspension. Zur Absorption gleicher Mengen des mit normalen Hammel-Blutkörperchen vorabsorbierten Serums wurden in einer Reihe verschiedene Sedimentmengen tuberkulinisierter Hammel-Blutkörperchen verwandt. Nach einer Absorptionszeit von 1 Stunde bei Zimmertemperatur wurden die einzelnen Abgüsse mittels der Hämolysetechnik geprüft.

Aus Tabelle 4 ist ersichtlich, dass behandeltes und unbehandeltes Tuberkulin völlig gleiche Normaltiter ergibt. Durch eine Neutralisation mit nur der halben (1 : 5), 1/4 (1 : 10) oder 1/8 (1 : 20) der normalerweise üblichen Tuberkulinmenge zeigt sich nur eine geringfügige Abschwächung des pepsinbehandelten GT Hoechst gegenüber dem normalen Tuberkulin.

TABELLE 4

Sensibilisation von Hammel-Blutkörperchen mit verschiedenen
GT Hoechst-Konzentrationen von:

GT Hoechst Op. Nr. 30					Pepsin-GT-Hoechst			
Verdünnung :	1 : 2,5	1 : 5	1 : 10	1 : 20	1 : 2,5	1 : 5	1 : 10	1 : 20
1 : 8	k	k	fk	sp	k	k	st	o
16	k	k	k-fk	w	k	k	st	o
32	k	k	st	sp	k	k-fk	st	o
64	k	fk	st	o	k	st	m	o
128	k	st	w	o	k	w	sp	o
256	st	m	o	o	m-st	o	o	o
512	w	o	o	o	sp	o	o	o
1024	o	o	o	o	o	o	o	o

TABELLE 5

Neutralisationsversuch

von je 0,6 ccm 1/4 Serum mit je 0,6 ccm

Neutralisationsversuch											
von je 0,6 ccm 1/4 Serum mit je 0,6 ccm											
GT Hoechst Op. Nr. 30						Pepsin-GTH Op. Nr. 30					
		Nativ	$\frac{1}{320}$	$\frac{1}{160}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{320}$	$\frac{1}{160}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{20}$
a)		Ha-Blkp. für Antigenlösung sensibilisiert mit GT Hoechst Op. 30.									
1	8	k	k	k	k	o	k	k	k	sp	o
	16	k	k	k	fk	o	k	k	fk-k	sp	o
	32	k	k	k	fk	o	k	k	fk	w	o
	64	k	k	k	m	o	k	k	fk	o	o
	128	k	k	m	sp	o	k	st	m	o	o
	256	st	st	sp	o	o	st-fk	sp	sp	o	o
	512	w	sp	o	o	o	m-w	o	o	o	o
	1024	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
b)		Ha-Blkp. für Antigenlösung sensibilisiert mit Pepsin-GTH Op. 30.									
1 :	8	k	k	k	w	o	k	k	w	o	o
	16	k	k	k	m	o	k	k	st	o	o
	32	k	k	k	m	o	k	k	m	o	o
	64	k	k	st	w	o	k	fk	w	o	o
	128	fk	st	m	sp	o	k	m	o	o	o
	256	st	w	o	o	o	st	w	o	o	o
	512	sp	o	o	o	o	sp	o	o	o	o
	1024	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
c)		Ha-Blkp. für Antigenlösung sensibilisiert mit GT Hoechst Op. 30.									
1 :	8		k	k	k	sp	k	k	k	w	o
	16		k	k	k	w	k	k	k	m	o
	32		k	k	fk	w	k	k	k	m	o
	64		k	k	fk	sp	k	k	fk	w	o
	128		fk	fk	m	o	k	fk	st	sp	o
	256		m	m	sp	o	st	m	w	o	o
	512		sp	o	o	o	w	w	o	o	o
	1024		o	o	o	o	o	o	o	o	o

Dieselbe durch Pepsinbehandlung bedingte Reduktion der serologischen Wirksamkeit zeigt sich auch in demselben geringfügigen Ausmass bei den Neutralisationsversuchen (s. Tab. 5) und Absorptionsversuchen (s. Tab. 6). Im Vergleich zu der durch eine Pepsinbehandlung zu erzielende völlige biologische Reaktionslosigkeit darf wohl diesem geringfügigem Verlust an serologischer Wirksamkeit keine grosse Bedeutung beigemessen werden; zudem wäre es denkbar, dass dies bereits durch die Veränderung des Antigen-Milieus (Entstehung von einfachen Peptiden auf Grund der Fermenteinwirkung) zu erklären wären.

Für die nicht essentielle Beeinflussung der serologischen Eigenschaft von GT Hoechst spricht aber vor allem die vergleichsweise durchgeführte Testung (mit einer mittels Pepsin-GTH hergestellten Antigenlösung) des mit normalem bzw. Pepsin-behandelten GT Hoechst neutralisierten (s. Tab. 5 b) bzw. absorbierten (s. Tab. 6 a) Serums. Auch hierbei waren keine prinzipiellen serologischen Unterschiede zwischen normalem und Ferment-behandelten Tuberkulin zu beobachten.

Es kann auf Grund der obigen Versuche nun nicht entschieden werden, ob die serologische wirksame Substanz tatsächlich von der hautwirksamen Komponente streng unterschieden ist, oder ob die durch die Pepsinbehandlung entstandenen einfacheren Peptide trotz ihrer biologischen Inaktivität noch eine volle Fähigkeit zur Sensibilisation, Neutralisation und Absorption besitzen. Diese Entscheidung könnte nur dann getroffen werden, wenn der Abbau der Eiweisskörper bis herunter zu den Aminosäuren erfolgt wäre.

Wie SCHIFF festgestellt und nachgewiesen hatte (12), besitzen verschiedene Op. Nr. eine unterschiedliche Brauchbarkeit vor allem für die Durchführung des Häm-agglutinationstests, was sich in einer verschiedenen Spezifität und Sensibilität äusserte. Zwar sind solche Unterschiede auch in biologischer Hinsicht bekannt geworden (7), doch ist es hier zum grossen Teil möglich, durch eine Veränderung der Konzentration zu der gewünschten Standardisierung zu gelangen (s. hierzu auch die verschiedenen Rest-N-Werte in Tab. 8).

TABELLE 6

Absorptionsversuch

1/8 Serum gemischt mit Ha. -Sed., das sensibilisiert wurde mit GT Hoechst

Op. Nr. 30

normal						nach Pepsin-Behandlung				
Menge:	0,0125	0,025	0,05	0,1	0,2	0,0125	0,025	0,05	0,1	0,2
a)	Ha. -Blkp. für Antigenlösung sensibilisiert mit Pepsin-GTH Op. 30									
1 : 8	k	k	o	o	.	k	k	sp	o	.
16	k	fk	o	o	.	k	k	sp	o	.
32	k	m	o	o	.	k	fk	o	o	.
64	fk	m	o	o	.	k	st	o	o	.
128	w	o	o	o	.	st	w	o	o	.
256	o	o	o	o	.	w	o	o	o	.
512	o	o	o	o	.	o	o	o	o	.

Op. Nr. 17

	normal					nach Pepsin-Behandlung				
b)	Ha. -Blkp. für Antigenlösung sensibilisiert mit Pepsin-GTH Op. 30									
1 : 8	.	k	k	fk	o	.	k	k	st	sp
16	.	k	k	st	o	.	k	k	st	o
32	.	k	k	m	o	.	k	k	m	o
64	.	k	fk	w	o	.	k	k	sp	o
128	.	fk	st	o	o	.	fk	st	o	o
256	.	st	sp	o	o	.	st	w	o	o
512	.	sp	o	o	o	.	o	o	o	o
1024	.	o	o	o	o	.	o	o	o	o

Im folgenden sollen die Ergebnisse unserer vergleichenden Untersuchungen der beiden Op. Nr. 17 und 30 auf diese unterschiedlichen serologischen Eigenschaften nochmals hinweisen.

Was die Hautwirksamkeit betrifft, so entsprach hierbei ursprünglich die Op. Nr. 30 der Op. Nr. 17 in dem angegebenen Gehalt von 75 000 T.E. pro ccm, jedoch war die Op. Nr. 17 im Ablauf von ungefähr 1 1/2 Jahren auf 60 000 - 65 000 T.E. abgefallen ¹⁾.

Wie Tabelle 7 zeigt, besitzt beim Hämagglutinationstest die Op. Nr. 17 nur noch die halbe und beim Hämolysetest nur noch 1/4 der sensibilisierenden Wirkung von Op. Nr. 30. Auch dies spricht eindeutig dafür, dass zumindest der hämosensibilisierende Mechanismus sich von dem Hautreaktionsvorgang in substantieller Hinsicht unterscheiden dürfte.

TABELLE 7

Sensibilisation von Hammel-Blutkörperchen mit verschiedenen GT ¹ Hoechst-Konzentrationen von:									
GT Hoechst Op. Nr. 17					GT Hoechst Op. Nr. 30				
Verdünnung:	1 : 2,5	1 : 5	1 : 10	1 : 20	1 : 2,5	1 : 5	1 : 10	1 : 20	
Ha. -Blkp. -Agglutination (normal)									
1 : 8	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16	(+)	+	-	-	++	+	+	-	-
32	+	-	-	-	(+)	+	-	-	-
64	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ha. -Blkp. -Hämolyse									
1 : 8	m	o	o	o	k	k	sp	o	
16	m	o	o	o	k	fk	w	o	
32	sp	o	o	o	k	st	sp	o	
64	o	o	o	o	fk	m	o	o	
128	o	o	o	o	st	w	o	o	
256	o	o	o	o	w	o	o	o	
512	o	o	o	o	o	o	o	o	

Eine entsprechende Reduktion auf die Hälfte zeigt sich auch bei den Neutralisations- und Absorptionsversuchen (s. Tab. 5c und 6 b). Diese Reduktion der serologischen Wirksamkeit möchten wir auf die etwa 1 1/2-jährige Lagerungsdauer zurückführen, zumal sich bei den von SCHIFF im Frühjahr 1954 berichteten Versuchsergebnissen ihre volle serologische Brauchbarkeit erwies. Vielleicht dürfte die an der gleichen Stelle (12) berichtete Abnahme der positiven Untersuchungsbefunde damit in Zusammenhang gebracht werden.

TABELLE 8

Verhältnis von	Op. Nr. 17	zu Op. Nr. 30
Rest-N ¹⁾	9,09 mg % 4	3,72 mg % 3
T.E. -Gehalt ¹⁾	30 = 35000 T.E. 4	75000 T.E. 5
Neutralisationswirkung	1	2
Absorptionswirkung	1	3
Sensibilisationswirkung bei :		
a) Hämagglutination	1	2
b) Hämolyse	1	4

1) Persönliche Mitteilung von D. Gericke.

Anmerkung zu Tab. 7: 1) Dieser Versuch wurde durchgeführt, nachdem ein Rest der Op. Nr. 17 10 Tage bei 5° C im Kühlschrank gestanden hatte. Das positive Tuberkuloseserum entstammte einer 2 Tage zuvor durchgeführten Blutentnahme und zeigte offensichtlich eine gewisse Titerabnahme der Tuberkuloseantikörper. Diese Versuche der Tabelle 7 können daher nur bedingt mit den in Tab. 4 wiedergegebenen Ergebnissen verglichen werden.

Alle diese eben besprochenen Untersuchungsergebnisse wurden durch eine 2. Versuchsserie (allerdings unter Verwendung desselben Serums) bestätigt.

In Tabelle 8 sind einige Daten über die Eigenschaften der beiden Op. Nr. 17 und 30 gegenübergestellt. Die einfachen Zahlen sollen ein Massstab für den Grad der jeweiligen Wirksamkeit sein.

Da unsere Kenntnisse über die indirekt hämagglutinierenden bzw. hämolysierenden Tuberkuloseantikörper noch sehr gering sind, bzw. es durchaus möglich ist, dass verschiedene positive Tuberkuloseseren eine spezifische unterschiedliche Antikörperwirkung entfalten können, prüften wir vergleichsweise Seren, die zur Routine-Untersuchung eingeschickt wurden mittels des Hämagglutinations- und Hämolysetestes, wobei die Antigenlösung einmal mit normalem, zum anderen mit Papain- bzw. Pepsin-behandeltem GT Hoechst hergestellt wurden. In Tabelle 9 ist das Ergebnis dieser Untersuchung aufgeführt. Es erwiesen sich beide Tuberkuline zwar von gleicher Spezifität, jedoch war die Sensibilität des Pepsin-behandelten Tuberkulins etwas geringer als die des normalen.

TABELLE 9

An 40 unbekannten Seren mit der indirekten Hämagglutination- und Hämolysereaktion festgestellte				
geprüft mit	<u>Positive Ausfälle:</u> Hämaggl. -Reaktion		<u>Positive Ausfälle:</u> Hämolys-Reaktion	
		isoliert positive:		isoliert positive:
GT Hoechst normal: Op. Nr. 30	13	2	15	2
Papain- bzw. Pepsin- behandeltes GT Hoechst Op. Nr. 30	11	-	13	-

In Ergänzung und Bestätigung der Untersuchungsbefunde von SCHIFF (12) ergibt sich, dass ausser durch Papaineinwirkung auch durch eine Behandlung mit Trypsin und Pepsin die spezifische Tuberkulinhautwirkung von GT Hoechst aufgehoben wird, während die hämosensibilisierenden Eigenschaften völlig intakt bleiben.

Hieraus darf mit Berechtigung geschlossen werden, dass beide Wirkungen dieses Präparates auf verschiedene chemische Substanzen zurückzuführen sind, wobei mit Sicherheit angenommen werden darf, dass die biologische Wirksamkeit an die Proteine gebunden ist. Die chemische Natur der für die serologische Wirkung verantwortlichen Substanzen wäre mittels chemischer Methode ausfindig zu machen. Mit grosser Wahrscheinlichkeit handelt es sich hier wohl um eine Substanz mit Polysaccharidcharakter. Hierfür sprechen die von SCHIFF (12) mittels des französischen Tuberkulins IP 48 St (Polysaccharid) und GT Hoechst durchgeführten Untersuchungen.

Es hat sich nämlich hierbei gezeigt, dass durch Neutralisation eines positiven Tbk.-Serums sowohl mit IP 48 St, als auch mit GT Hoechst in jedem Falle die hämagglutinogenen bzw. hämolysinogenen Eigenschaften von einerseits mit IP 48 St, andererseits mit GT Hoechst sensibilisierten Blkp. aufgehoben wird. Für die Annahme dieser polysaccharidartigen Substanz spricht weiterhin die Tatsache, dass das biologisch kaum wirksame Polysaccharid IP 48 St ebenfalls aus einem gereinigten Tuberkulin, nämlich dem IP 48 isoliert werden konnte, während als 2te Fraktion das IP 48 Pt ein Protein darstellt mit ausserordentlich spez. Hautwirksamkeit. Aus unseren Befunden kann ferner abgeleitet werden, dass zur Sensibilisation nur die Polysaccharide befähigt sind, da kein entscheidender Unterschied zwischen neutralisierender und sensibilisierender Fähigkeit des GT Hoechst vor und nach Pepsin-Einwirkung zu verzeichnen war. Es wäre allerdings theoretisch denkbar, dass die durch Pepsin-Einwirkung entstandenen Eiweissabbau-Produkte (einfachere Peptide) zwar keine Hautwirkung mehr hervorrufen können, jedoch noch weitgehend serologische Eigenschaften besitzen.

Es wäre auch bei unseren Versuchen an die Möglichkeit zu denken, dass unsere Befunde zu einem gewissen Grade von der Eignung der verwandten Seren abhing, zumal GRABAR, BOYDEN, TACQUET und BORDUAS (4) glaubten feststellen zu können, durch Absorptionsversuche mit sensibilisierten Blkp. die Existenz von 2 unabhängigen hämagglutinierenden Antikörpern gegen Proteine (P.P.D. Weybridge) und gegen Polysaccharide (IP 48 St) nachgewiesen zu haben.

Bei Gültigkeit dieser Anschauung ist die Klärung der widersprechenden Angaben über die Natur des eigentlichen Tuberkulin-Hämosensitins zu erwarten. Auf Grund unserer Untersuchungsergebnisse neigen wir zu der Annahme, dass Tuberkulo-Proteine an sich gegenüber normalen Blkp. kein ins Gewicht fallendes Adsorptionsvermögen und damit keine Sensibilisationsfähigkeit besitzen, sondern ebenfalls auf das Vorhandensein von polysaccharidartigen Substanzen zurückzuführen ist.

Damit würde die Theorie von BRODHAGE (2), der für die Sensibilisation von Blkp. ein Polysaccharid-Proteinkomplex verantwortlich macht, wenig Wahrscheinlichkeit besitzen. Dasselbe dürfte die Annahme von BOYDEN (1) betreffen, der der Auffassung ist, dass die Proteine sich erst dann an die Erythrozyten lagern können, wenn vorher eine Absorption von Polysacchariden stattfand. Somit stehen unsere Untersuchungsbefunde in Übereinstimmung mit den von MIDDLEBROOK und DUBOS (10), die auch den Polysacchariden hauptsächlich die hämosensibilisierende Fähigkeit zuschreiben.

Auf Grund unserer Resultate ergibt sich in praktischer Hinsicht, dass sowohl das im Tuberkulin enthaltene und serologischen Zwecken dienende Hämosensitin in einem chemischen Verfahren von der hautwirksamen Fraktion getrennt als auch das für den Hauttest bestimmte Tuberkulin von der serologisch wirksamen Substanz befreit wird, um bei den beiden Reaktionen eine Beeinflussbarkeit durch diese an sich jeweils überflüssigen Komponenten auszuschliessen.

Zusammenfassung:

Es konnte nachgewiesen werden, dass durch einen fermentativen Abbau des Tuberkulins GT Hoechst mittels Papain, Trypsin und Pepsin zwar dessen Hautwirksamkeit aufgehoben wird, jedoch seine hämosensibilisierenden Eigenschaften völlig unbeeinflusst lassen. Es muss hieraus geschlossen werden, dass beide Eigenschaften auf der Wirkung verschiedener Substanzen beruhen. Die biologisch aktive Komponente stellt sicherlich ein Protein dar, während das eigentliche Hämosensitin Polysaccharidcharakter besitzen dürfte.

Für den differenten Charakter der hautwirksamen und hämosensibilisierenden Substanz spricht ausserdem, dass durch eine Proteolyse (Pepsin) sich praktisch nicht die Sensibilisations-, Neutralisations- und Absorptionswirkungen des Tuberkulins ändern.

Verschiedene Op. Nr. von GT Hoechst erwiesen sich bei gleicher Hautwirksamkeit von unterschiedlicher Sensibilisations-, Neutralisations- und Absorptionswirkung.

Diese Ergebnisse bedeuten in praktischer Hinsicht, dass zur Durchführung der Hauttests, sowie der indirekten Hämagglutinations- und Hämolysereaktionen auf Tuberkulose die jeweils isolierten spezifischen Substanzen von industrieller Seite aus zur Verfügung gestellt werden.

L i t e r a t u r

- 1) BOYDEN, S.V.: J. exp. Med. 93, 107, (1951).
- 2) BRODHAGE, H.: Erg. Hyg. 28, 123, (1954).
- 3) GERNEZ-RIEUX, Ch. et A. TACQUET:
Progr. Explor. Tuberc.
S. Karger, Bâle-New York 5, 66, (1952).
- 4) GRABAR, P., S. BOYDEN, A. TACQUET et
A. BORDUAS: C. r. Acad. Sci. 234, 899, (1952).
- 5) HALL, W.: Bull. Univ. Minnesota Hosp.
a. Minnesota Med. Found. 22, 557, (1951).
- 6) LAMENSANS, A. P. GRABAR, u. J. BRETEY:
C. R. Acad. Sci. 232, 1967, (1951).
- 7) LINDNER, F.: Behring-Werk Mitteilungen, 27, 165, (1953).
- 8) MIDDLEBROOK, G: Adv. Tuberc. 3, 124 (1950).
- 9) " : Am. Rev. Tuberc. 62, 223, (1950).
- 10) MIDDLEBROOK, G. u. R. J. DUBOS: J. Exp.
Med. 88, 521, (1948).
- 11) SCHIFF, W. : Klin. Wschr. 32, 342, (1954).
- 12) " : Z. f. Imm.forsch. 112, 57, (1955).
- 13) SCHIFF, W. u. E. SEIDLITZ: Ebenda 111, 69, (1954).
- 14) SEIBERT, F. B.: Science 63, 619, (1926).
- 15) " : Am. Rev. Tuberc. 59, 85, (1950).
- 16) SEIBERT, F. B. u. Glenn: Ebenda 44, 9, (1941).

Herrn Dr. med. W. Schiff danke ich für seine wertvollen Ratschläge
bei der Ausführung dieser Arbeit.

L e b e n s l a u f

Ich, Günter Becker, Sohn des Steuerinspektors Gustav Becker und seiner Ehefrau Luise, geborene Schlockermann, wurde am 6. Juli 1925 in Eschwege geboren und kam nach 4-jähriger Grundschulzeit 1936 auf das Realgymnasium in Eschwege, von dem ich 1943 mit dem Reifevermerk zu einer 3-monatigen Arbeitsdienstzeit abberufen wurde. Von Januar 1944 bis Kriegsende war ich als Sanitätsfahnenjunker bei der Fallschirmtruppe und blieb bis Mai 1946 in englischer Gefangenschaft.

Nach Ablegen des Abiturs und nach einer einjährigen Ausbildung als studentischer Krankenpflegeschüler begann ich 1949 in Frankfurt das medizinische Studium und bestand dort im Jahre 1954 das Staatsexamen.

Nach 5-monatiger Pflichtassistentenzeit an dem Hygienischen Institut in Frankfurt bin ich jetzt als solcher im Kreiskrankenhaus in Eschwege tätig.

